

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. März 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/023057 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

[DE/DE]; Krottenkopfstrasse 28A, 82362 Weilheim (DE).
STEFFENS, Pia [DE/DE]; Bäckkamp 29, 30900 Wedemark (DE). KREHAN, Alf-Andreas [DE/DE]; Schönenfelder Str. 5, 30853 Langenhagen (DE). WASCHÜTZA, Stefanie [DE/DE]; Wiesenstrasse 46a, 30169 Hannover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP02/05489**

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. Mai 2002 (17.05.2002)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(74) Anwalt: **PFENNING, MEINING & PARTNER GBR**;
Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) Angaben zur Priorität:

101 43 691.2 6. September 2001 (06.09.2001) DE
101 43 699.8 6. September 2001 (06.09.2001) DE
101 43 775.7 6. September 2001 (06.09.2001) DE
101 43 776.5 6. September 2001 (06.09.2001) DE
PCT/EP01/13606 22. November 2001 (22.11.2001) EP

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): ADNAGEN AG [DE/DE]; Ostpassage 7, 30853 Hannover-Langenhagen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ALBERT, Winfried

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DIAGNOSIS KIT FOR SELECTING AND OR QUALITATIVE AND/OR QUANTITATIVE DETECTION OF CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND DIAGNOSE-KIT ZUR SELEKTIONIERUNG UND/ODER ZUM QUALITATIVEN UND/ODER QUANTITATIVEN NACHWEIS VON ZELLEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for selecting and/or qualitative and/or quantitative detection of predetermined biological cells from, for instance, a sample or in a sample containing biological cells, said sample being mixed with a predetermined combination of at least two antibodies and/or antibody derivatives which preferably bind via the binding sites thereof to various epitopes of the cells which are to be selected or detected, and/or with at least one biospecific antibody and/or antibody derivative which preferably bind(s) via the binding sites thereof to various epitopes of the cells which are to be selected or detected. The cells which are marked with at least one of the antibodies and/or antibody derivatives are separated from the sample and the separated cells are monitored by means of a predetermined combination of at least two molecular-biological analytical reagents which preferably react with at least one component of the cells which are to be selected or detected.

(57) **Zusammenfassung:** Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektionierung und/oder zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von vorbestimmten biologischen Zellen aus bzw. in einer biologischen Zellen enthaltenden Probe, wobei die Probe mit einer vorbestimmten Kombination von mindestens zwei Antikörpern und/oder Antikörperderivaten, die mit ihren Bindungsstellen an verschiedene Epitope der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise binden, und/oder mit mindestens einem biospezifischen Antikörper und/oder Antikörperderivat, der/das mit seinen beiden Bindungsstellen an unterschiedliche Epitope der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise bindet, versetzt wird, die mit mindestens einem der Antikörper und/oder Antikörperderivate markierten Zellen aus der Probe abgetrennt werden, und die abgetrennten Zellen mit einer vorbestimmten Kombination mindestens zweier molekularbiologischer Nachweisreagentien geprüft werden, wobei die mindestens zwei Nachweisreagentien mit mindestens einem Bestandteil der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise reagieren.

WO 03/023057 A2



Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren und Diagnose-Kit zur Selektionierung
und/oder zum qualitativen und/oder quantitativen
Nachweis von Zellen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und
 () ein Diagnose-Kit zur Selektionierung und/oder zum
 qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Zel-
 len in einer Probe. Derartige Nachweisverfahren und
 Diagnose-Kits werden insbesondere bei der Diagnostik
10 oder Behandlungskontrolle von Tumorerkrankungen benö-
 tigt. Denn im Rahmen der Krebsvor- oder -nachsorge
 ist es von großer Wichtigkeit maligne Tumore bzw. re-
 zidive maligne Tumore anhand des Auftretens metasta-
 sierender Tumorzellen im Blut frühzeitig nachweisen
15 zu können. Das vorliegende Verfahren und der vorlie-
 gende Diagnose-Kit werden jedoch nicht nur hier ein-
 gesetzt sondern können ganz grundsätzlich zum Nach-
 weis und zur Erkennung von seltenen Zellen in bio-
 logische Zellen enthaltenden Proben eingesetzt werden.
20 Dies kann beispielsweise auch zum Nachweis von föta-

len Zellen in maternalem Blut oder auch zum Nachweis von Stammzellen erfolgen.

Hodenkrebs ist für weniger als 2% aller bösartigen 5 Neubildungen von Tumoren beim Mann verantwortlich. Allerdings handelt es sich bei 20-30% aller Krebserkrankungen unter 40jähriger Männer um Hodenkrebs. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen beispielsweise in 10 der Bundesrepublik Deutschland beträgt ca. 3600, wobei ca. 240 Männer an Hodenkrebs sterben. Die höchste Inzidenz findet man dabei zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr. Durch den Fortschritt in der onkologischen Therapie können heute über 90% aller Betroffenen langfristig geheilt werden. Die hohen Überlebensraten 15 begründen sich dabei in der ausgeprägten Wirksamkeit der cis-Platin-basierenden Chemotherapien.

Brustkrebs ist die häufigste Diagnose, wenn eine Tumorerkranlung bei Frauen festgestellt wird (26,4% aller Neuerkrankungen). Trotz massiver Bemühungen, die 20 in Früherkennung, Behandlung und Nachsorge aufgewendet werden, rangiert diese Erkrankung immer noch an erster Stelle krebsbedingter Todesursachen bei der Frau. Die Erkrankungszahlen in den westlichen Industrieländern nehmen in den vergangenen Jahren trotz 25 verstärkter Bemühungen um die Früherkennung weiter zu. Problematisch ist die hohe Metastasierungsrate nach Erstbehandlung, die in der Mehrzahl der Fälle bereits nach 1-3 Jahren zum Tod der Patientin führt. Hauptgrund hierfür ist die Streuung von Tumorzellen 30 in frühen Stadien der Tumorentwicklung. Neben der Ersterkennung eines Mammakarzinoms ist daher insbesondere der frühestmögliche Nachweis metastasierender Zellen für eine erfolgreiche Behandlung von entscheidender Bedeutung. Ebenso kann im klinischen Stadium I 35 ein definitiver Negativnachweis hilfreich sein, wenn zu entscheiden ist, ob die Patientin mit einer Chemo-

therapie oder einer Operation belastet werden muß.

5 Beim kolorektalen Primärtumor ist die Tumorprogression nach der Resektion in erster Linie auf residuale Tumorzellen zurückzuführen. Diese Zellen werden prä- oder intraoperativ aus dem primären Tumor abgelöst und erhalten die Möglichkeit zur Verstreuung im ganzen Organismus.

10 Neben der Ersterkennung eines kolorektalen Karzinoms ist daher insbesondere der frühestmögliche Nachweis metastasierender Zellen für eine erfolgreiche Behandlung von entscheidender Bedeutung.

15 Dabei gilt es, im klinischen Stadium 1 der Erkrankungen zu entscheiden, ob der Patient mit einer Chemo-therapie und/oder mit einer Operation belastet werden muß, um einen dauerhaften Heilungserfolg zu erzielen. Eine große Anzahl von Patienten wird dabei chemothe-
20 rapeutisch behandelt, obwohl kein gesicherter Nach-
weis einer Metastasierung vorliegt. In den Konzepten, die auf einer reinen Überwachung aufbauen, kommt es jedoch in 25% der Fälle zu Rezidiven mit zum Teil tödlichem Ausgang.

25 Bei den derzeit angewandten Untersuchungsmethoden werden bei Krebspatienten sogenannte Tumormarker auf Proteinebene (immunologisch bzw. enzymatisch) quantitativ im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten ermittelt. Diese Nachweisverfahren sind jedoch für die Tumordiagnostik bzw. Behandlungskontrolle/Nachsorge bei Tumoren nur bedingt geeignet, da erhöhte Tumormarkerwerte in Körperflüssigkeiten auch durch nicht-tumoröse Erkrankungen, wie beispielsweise Entzündungen des Magen-Darm-Traktes, Leberzirrhose, Virusinfekte oder starkes Rauchen hervorgerufen werden kön-

nen.

5 Molekulargenetische Verfahren erscheinen hier für den Nachweis von Tumorzellen im peripheren Blut hilfreich, da am Beginn des Metastasierungsprozesses der Übertritt von Tumorzellen ins venöse Blut stehen kann.

10 Die EP 0 520 794 B1 offenbart ein derartiges Verfahren, bei dem Metastasierungen in Körpergeweben oder Flüssigkeiten erfaßt werden. Dabei werden Nukleinsäuren erfaßt, beispielsweise mittels Vervielfältigung durch Polymerase-Kettenreaktion. Das Verfahren beruht nun entscheidend darauf, daß die nachgewiesene Nukleinsäuresequenz in Zellen des Herkunftsgewebes eines Tumors exprimiert wird, d.h. in Tumorzellen und markerabhängig auch in den gesunden Zellen des Herkunftsgewebes. Weitere Bedingung ist, daß diese Sequenz normalerweise nicht in denjenigen Zellen exprimiert wird, deren Gewebe untersucht wird. Wird also eine entsprechende Sequenz in der untersuchten Probe gefunden, so muß diese von verschleppten, d.h. metastasierenden Zellen eines ortsfremden Tumors herrühren. Damit beruht dieses Verfahren letztlich auf dem Nachweis von Zellen, die in der Blutprobe von gesunden Personen nicht vorkommen sollten.

15 ()

20

25

30 Insgesamt ist festzustellen, daß die derzeit verwendeten diagnostischen Methoden zu ungenau sind, wenn es um die Beurteilung der malignen Potenz von Resttumoren nach durchgeföhrter Chemotherapie in den metastasierenden Stadien geht. Es gilt also weiterhin, Nachweise für eine okkulte bzw. restliche Metastasierung zu finden, die eine rechtzeitige Einordnung in die vielfältigen primär kurativen therapeutischen Optionen zulassen. Wesentliches Problem ist es hierbei,

35

daß die zu erfassenden Zellen, beispielsweise Tumorzellen im peripheren Blut, nur in extrem geringer Zahl vorkommen.

5 Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren und ein Diagnose-Kit zur Verfügung zu stellen, mit dem auf einfache, sichere und wiederholbare Weise seltene biologische Zellen in einer biologische Zellen enthaltenden Probe mit hoher Sensitivität und Spezifität ausgewählt und/oder nachgewiesen werden können.

10 15 Diese Aufgabe wird durch das Verfahren nach Anspruch 1 sowie durch das Diagnose-Kit nach Anspruch 29 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens und des erfindungsgemäßen Diagnose-Kits werden in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

20 25 Entscheidend bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nun, daß zuerst die zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen mittels einer Kombination von Antikörpern oder Antikörperderivaten oder einem bispezifischen Antikörper oder Antikörperderivat markiert werden. Dadurch ist es möglich, insbesondere die gesuchten Zellen zu markieren, abzutrennen und damit anzureichern. Dies bedeutet, daß in einem ersten Schritt ein kombinierter immunologischer Nachweis bzw. Selektionierung erfolgt. Unter Antikörperderivat wird in dieser Anmeldung jede Art von veränderter Antikörper oder Antikörperfragment verstanden, das eine Bindungsstelle aufweist, beispielsweise einkettige Antikörper, Antikörperfragmente wie FAB-Fragmente oder rekombinante Antikörper. Im folgenden sind, wenn von „Antikörper“ gesprochen wird, immer Antikörper und/oder Antikörperderivate bezeichnet.

30 35

In einem zweiten Schritt werden dann auf molekularbiologischer Basis mit einer vordefinierten Kombination von Nachweisreagentien mindestens ein Marker erfaßt, der für die gesuchten Zellen spezifisch ist bzw. in diesen präferentiell zu finden ist, so daß hier wiederum spezifisch die gesuchten Zellen ausgewählt werden. Es handelt sich hier also um einen kombinierten molekularbiologischen Nachweis. Grundgedanke der vorliegenden Erfindung ist also, einen Nachweis über eine Kombination immunologischer Parameter mit einem Nachweis über eine Kombination molekularbiologischer Parameter zu kombinieren. Überraschenderweise ergeben sich hierdurch ganz hervorragende Nachweisergebnisse, mit denen in Detektionsbereiche vorgestoßen wird, die sämtlichen bekannten Techniken aus dem Stand der Technik bisher nicht zugänglich waren. So können Konzentrationen gesuchter Zellen in Blutproben bis herab zu zwei Zellen pro 5 Milliliter noch nachgewiesen werden. Eine derartige Spezifität und Sensitivität wird bisher im Stand der Technik nicht erreicht.

()

Eukaryontische Zellen tragen eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle an ihrer Zelloberfläche. Entsprechend des Ursprungs und der Funktion der einzelnen Zelle unterscheidet sich die Kombination der exprimierten Oberflächenmoleküle, so daß zelltypspezifische Muster entstehen. Zur Erkennung dieser zelltyp-spezifischen Muster werden Antikörper genutzt. Antikörper binden mit hoher Spezifität an ihr Antigen, hier an ausgewählte Oberflächenmoleküle. Diese Eigenschaft wird genutzt, um Zellen mittels spezifischer Antikörperbindung anhand ihrer Zelltypspezifischen Muster zu erkennen und voneinander zu unterscheiden.

So unterscheidet beispielsweise die Expression spezieller Oberflächenproteine von Tumorzellen von nicht-transformierten Zellen dieses Zelltyps.

5

Dem Nachweis der Marker geht eine Selektion der Zielzellen über die Bindung verschiedener Antikörper an die gesuchten Zellen voraus. Denn die Expression spezieller Oberflächenproteine unterscheidet Zellen eines Typs von Zellen eines anderen Typs. So unterscheidet beispielsweise die Expression spezieller Oberflächenproteine Tumorzellen von nicht-transformierten Zellen dieses Zelltyps.

10

Da sich das spezielle Muster der Oberflächen-Antigene beispielsweise bei Tumorzellen auch von den Blutzelltypischen Mustern unterscheidet, können Tumorzellen im Blut unterschieden werden. Um Tumorzellen zu identifizieren, werden Antikörper, die diese speziellen Oberflächenproteine spezifisch erkennen, als Werkzeuge genutzt. Die spezifische Antikörperbindung wird für verschiedene Analyse- und Separations-Methoden nutzbar gemacht.

20

25 Aufgrund der intensiven Bindung von speziell dafür selektionierten Immunglobulinen ist neben der Erkennung von Zellen über deren Oberflächenepitope auch eine Separierung der erkannten Zellen von nicht erkannten möglich.

30

Verschiedene Trennprinzipien sind möglich:

1. Trennprinzip beruhend auf Flüssigphase; z.B. Durchflußzytometrie:

35

Für die durchflußzytometrische Analyse werden Anti-

körper mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Vereinzelte Zellen werden in einem konstanten Flüssigkeitsstrom einzeln an einer Lichtquelle (Laser) vorbeigeleitet. Bei Beleuchtung der Zellen werden die an den Antikörpern gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und strahlen Licht bestimmter Wellenlängen ab. Das abgestrahlte Licht wird detektiert und das gemessene Signal digitalisiert gespeichert. Das Lichtsignal kann einzelnen Zellen zugeordnet werden. Die Antikörper-markierte Zelle wird so erkannt und kann nun von anderen Zellen getrennt werden. Zur Trennung werden die Zellen in kleinsten Tropfen vereinzelt. Nach Erkennung der Antikörper-markierten Zelle wird der entsprechende Tropfen in ein Auffangbehältnis gelenkt.

10 Eine derartige Anreicherung kann beispielsweise durch FACS-Durchflußzytometrie erfolgen. Dabei werden beispielsweise angereicherte Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonaren Antikörpern gegen tumorspezifische Oberflächenproteine inkubiert. Die markierten Zellen werden zweifach mit PBS gewaschen und im Anschluß werden 10^7 Zellen in 1 ml PBS resuspendiert.

15 () Für die Isolierung der Tumorzellen wird ein FACS Vantage SE-Durchflußzytometer (Becton Dickinson) verwendet. Über das CellQuest Programm erfolgen Datenaufnahme, Instrumentenkontrolle und Datenauswertung. Die sortierten Zellen werden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (gefüllt mit 1 ml PBS) überführt. Die RNS kann dann wie später beschrieben isoliert werden.

20 25 30 2. Trennprinzip beruhend auf Festphase; z.B. magnetische Separation:

Für die magnetische Separation werden Antikörper an pseudomagnetische Partikel gekoppelt. Nach Einbringen der pseudomagnetischen Partikel in ein Magnetfeld wandern die Partikel im magnetischen Feld. Bei der

Bewegung in diesem magnetischen Feld werden Zellen, an die diese gekoppelten Antikörper gebunden sind, mitgerissen und von anderen Zellen getrennt.

5 Zur Zellerkennung mittels Magnetpartikel werden folglich an pseudomagnetische Partikel, die eine definierte Anzahl an chemisch aktivierten Stellen auf ihrer Oberfläche besitzen, Antikörper gekoppelt. Koppelungsverfahren sind beispielsweise aus James P.
10 Gosling, Solid-phase Concepts and Design, in: R.F. Masseyeff, W.H. Albert N.A. Staines (eds), Methods of Immunological Analysis, Vol. 1, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp. 507-529 bekannt. Über die Spezifität der Antikörper wird die Spezifität der
15 Trennung bestimmt. Eine Ziel-Zellen enthaltende Blutprobe wird mit Antikörper-gekoppelten Magnetpartikeln versetzt; dann werden Partikel und Blut relativ zu einander bewegt, beispielsweise durch "Über-Kopf-Rotieren" in einem geschlossenen Behälter befindlicher Proben oder durch Bewegung der Partikel aufgrund wechselnder Magnetfelder. Jene Ziel-Zellen, die von einem der Festphase-gebundenen Antikörper erkannt und damit fest gebunden werden, folgen der Bewegung der Partikel. Hierdurch ist es möglich, bei Anlegen eines
20 magnetischen Feldes, die Partikel mit den daran gebundenen Zellen aus dem Blut herauszuziehen (z.B. an die Wand des Trenngefäßes). Das auf diese Weise Ziel-Zellen-depletierte Blut kann gegen andere Lösungen ausgetauscht werden, wobei die über Magnetpartikel
25 separierten Zellen bis zum Abschalten/Entfernen des Magnetfeldes vor Ort verbleiben und für weitere Anwendungen zur Verfügung stehen.

30 Alternativ zu den dargestellten Trennprinzipien sind auch jegliche andere Trennprinzipien aus dem Stand der Technik, die auf der Markierung von Zellen mit
35

Antikörpern beruhen, einsetzbar.

5 Erfnungsgemäß werden vorteilhafterweise für die Erkennung der Tumorzellen spezifische Antikörper-Mischungen verwendet. Beispielsweise eignet sich zur Erkennung von Tumorzellen im Blut eine Kombination der Antikörper MOC-31 und Ber-EP4.

10 Tabelle 1: Antikörper-Mischung

| Antigen | Klon | Konzentration |
|----------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Epith.Rel.Antigen | MOC-31 (Fa. Novocastra) | 1,25 µl/10 ⁶ Zellen |
| Epitheliales Antigen | Ber-EP 4 (Fa. DAKO) | 0,924 µg/10 ⁶ Zellen |

15 Mittels der Antikörpermischung in der vorhergehenden Tabelle 1 werden bevorzugt Tumorzellen, jedoch mit hoher Spezifität erfaßt. Dies beruht auf der bevorzugten Expression bestimmter Oberflächenproteine, die Krebszellen von anderen Zellen unterscheidet.

20 Derartige Antikörpermischungen zeigen im Vergleich zu den jeweils separat eingesetzten Antikörpern bei der Zellerkennung und Zelltrennung unabhängig von der angewandten Methode eine erhöhte Sensitivität.

25 Die vorliegende Erfnung beruht weiterhin wesentlich darauf, daß nicht etwa auf immunologischer oder enzymatischer Ebene Zellmarker im Blut von Patienten nachgewiesen werden, sondern daß ein molekularbiologischer Marker, beispielsweise die mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure) von gesuchten Zellen in einer Probe beispielsweise einer Blutprobe, nachgewiesen wird.

30 Da einzelne Marker in therapieabhängiger Weise unterschiedlich exprimiert werden, wird vorteilhafterweise eine Kombination von Tumormarkern untersucht, um alle

im Blut zirkulierenden Tumorzellen zu erfassen. Hierdurch lassen sich Tumorzellen auch dann erkennen, wenn die Expression eines bestimmten Markers bei einem Patienten bzw. in einem Krankheitsstadium relativ gering ist, was sonst zu einem vermeintlich negativen Ergebnis führen könnte. Die Verwendung von Markern stößt jedoch meist deswegen auf Grenzen, weil mononukleäre Blutzellen eine Hintergrundexpression ("illegalen Transkription") aufweisen, die eine exakte Analyse behindern.

Als Marker, beispielsweise für Tumoren, wird die Expression der in Tabelle 2 genannten Gene erfaßt. Der Nachweis kann dabei für einen oder zwei Marker oder auch für eine beliebige Anzahl dieser Tumormarker in Kombination miteinander durchgeführt werden. Das erfindungsgemäße Kit kann daher zwei Oligonukleotidpaare für einen, zwei oder eine beliebige Auswahl oder auch alle der Tumormarker enthalten.

()

Tabelle 2

| Gen bzw. Genprodukt | Gen | Alternativ-bezeichn.. |
|---|---------------------------|-----------------------|
| Human carcinoma-associated antigen GA733-2 gene | GA733-2 | GA733.2 |
| Human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene | EGFR | EGFR |
| Human carcinoembryonic antigen (CEA) gene | CEA | CEA |
| Homo sapiens mucin 1 (MUC1) | MUC1 | CA15-3 |
| Homo sapiens C-erb B2/neu protein (ERBB2) gene | HER-2/neu | HER-2 |
| Homo sapiens claudin 7 (CLDN7), mRNA | claudin7 (CLDN7) | Claudin-7 |
| Alkaline phosphatase, placental-like (Nago isozyme), (Germ-cell alkaline phosphatase), (PLAP-like) | ALPPL2 (GCAP) | PLAP |
| Homo sapiens gastrin-releasing peptide receptor (GPPR) gene | GRPR | GRPR |
| Homo sapiens high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein isoform I-C (HMGIC), mRNA | HMGIC | HMGI-C |
| Homo sapiens gene for cytokeratin 20 | CK20 | CK20 |
| Human MAGE-3 antigen (MAGE-3) gene | MAGE-3 | MAGE-3 |
| Homo sapiens stanniocalcin 1 (STC1) gene | Stanniocalcin 1 (STC1) | Stanniocalcin |

5 Dadurch werden alle diejenigen Fälle richtigerweise vernachlässigt, bei denen beispielsweise aufgrund von anderen Krankheiten ebenfalls die Tumormarker exprimiert werden und lediglich als Protein in die Blutbahn gelangen. Es werden folglich aufgrund des ersten 10 immunologischen Auswahlsschrittes lediglich Zellen erfaßt, die zum einen sich selbst in der Blutprobe befinden und zum anderen den oder die jeweiligen Tumormarker exprimieren. Dabei handelt es sich folglich um Tumorzellen, die aus ihrem ursprünglichen Tumorgewebe stammen und in das Blut der Patienten verschleppt 15 wurden. Da im Blut nicht an einem Tumor Erkrankter die mRNA der untersuchten Marker normalerweise nicht

exprimiert wird, zeigt sich eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten der zugehörigen mRNA und einer Metastasierung schon im frühen Stadium im Metastasierungsprozeß.

5

Dabei wird vorteilhafterweise nicht nur die mRNS eines einzelnen Tumormarkers erfaßt sondern eine Kombination von Markern untersucht. Dadurch ist es möglich, Krebsformen über ihre im Blut metastasierenden Zellen erfassen zu können. Dies bedeutet, daß im Falle von Hodentumoren sowohl seminöse als auch nichtseminöse Hodenkrebsformen bzw. auch Mischtumore mit Anteilen eines Seminoms und damit 90-95 % aller malignen Tumore des Hodens, nämlich sämtliche Keimzelltumoren, erfaßt werden.

10

15

Für die Erkennung von Hodentumorzellen wird daher erfundungsgemäß eine Kombination von mindestens zwei der folgenden Marker vorgeschlagen:

20

- GA733.2
- () - GCAP/PLAP
- HMGI-C
- GRPR,

25

Für die Erkennung von Brustkrebszellen wird erfundungsgemäß eine Kombination von mindestens zwei Tumormarkern der folgenden Markergruppen vorgeschlagen:

30

- a) EGFR, CEA, Stanniocalcin, MAGE 3, CK20, Claudin 7, Her-2/neu, MUC1 und GA 733.2;
- b) CK20, MAGE 3 und MUC1
- c) Her-2/neu und Claudin7 sowie
- d) EGFR, CEA und Stanniocalcin

35

Für die Erkennung von Darmkrebszellen wird erfund-

dungsgemäß eine Kombination von mindestens zwei Tumormarkern der folgenden Markergruppen vorgeschlagen:

5 a) CK20, EGFR, GA 733.2, CEA und Stanniocalcin
b) CK20, EGFR, CEA und Stanniocalcin sowie
c) EGFR, CEA und GA 733.2

10 Im folgenden werden einige Beispiele gegeben, aus denen hervorgeht, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Nachweis sensitivität erzielt wird, die über alles bisher im Stand der Technik bekannte weit hinausgeht. Die Figuren 1 bis 10 zeigen Ergebnisse verschiedener Versuchsprotokolle.

15 Gemeinsam für sämtliche Beispiele ist das grundsätzliche Vorgehen, das einen ersten Schritt mit immunologischer Anreicherung von Zielzellen und einen zweiten Schritt eines Nachweises von mRNS-Markern in den immunologisch angereicherten Zellen umfaßt. Im folgenden werden diese Schritte in allgemeiner Form beschrieben, soweit sie für sämtliche Beispiele identisch sind.

20 1. Immunologische Anreicherung der Zielzellen aus peripherem Blut

25 Zuerst wurde eine periphere Blutprobe entnommen und dieser eine definierte Anzahl von Zielzellen hinzugegeben, beispielsweise 2, 10, 100 Zellen eines bestimmten Tumortyps.

30 Weiterhin wurden Antikörper an Magnetpartikel gekop-

pelet. Als Antikörper wurden dabei die im folgenden in Tabelle 3 dargestellten Antikörper verwendet.

Tabelle 3

5

| Antigen | Klon | Firma |
|------------------------------|-----------|--------------------------|
| Epitheliales Membran Antigen | GP1.4 | Novocastra |
| Epitheliales Antigen | MOC-31 | Novocastra |
| Epitheliales Antigen | Ber-EP4 | DAKO |
| Muc 1 | HMPV.2 | Pharmingen |
| PLAP | 8B6 | Cymbus Biotechnology LTD |
| Epitheliales Membran Antigen | E29 | DAKO |
| Epitheliales Membran Antigen | 131-11741 | HISS |

10

Die Magnetpartikel wurden dabei mit einer Partikelkonzentration von 4×10^8 beads/ml (CELLection™ Pan Mouse IgG Kit, Firma Dynal) verwendet. Die Verhältnisse zwischen der Antikörperkonzentration und den daran gekoppelten Antikörpern sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

15

Tabelle 4

| Klon | Antikörperkonzentration | μ l Antikörper/25 μ l Partikel |
|-----------|--|--|
| BerEP4 | 0,1 mg/ml | 4 μ l |
| HMPV.2 | 0,5 mg/ml | 4 μ l |
| MOC31 | k.A. Verdünnung s. Herstellerangaben (Lyophilisat) | 4 μ l |
| GP1.4 | k.A. Verdünnung s. Herstellerangaben (Lyophilisat) | 4 μ l |
| 8B6 | 0,1 mg/ml | 1 μ l |
| 131-11741 | 0,5 mg/ml | 4 μ l |
| E29 | 0,1 mg/ml | 4 μ l |

Die so vorbereiteten Magnetpartikel wurden je nach

5 Versuchsansatz und Nachweissystem dem Blut zugegeben. Der entsprechende Zusatz Antikörper-gekoppelter Magnetpartikel pro ml Blut bei einer Ausgangskonzentration von 4×10^8 beads/ml Partikel ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5

| Antikörper | Tumor | Brustkrebs- diagnostik | Darmkrebs- diagnostik | Hodenkrebs- diagnostik |
|------------|-------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| BerEP4 | | 8,3 µl | 10 µl | 8 µl |
| HMPV.2 | | 8,3 µl | | |
| MOC31 | | | 10 µl | 8 µl |
| GP1.4 | | 8,3 µl | | |
| 8B6 | | | | 4 µl |

10 Nach 2-stündiger Inkubation im Überkopfschüttler wurden die Magnetpartikel, die gegebenenfalls als Zell-Antikörper-Magnetpartikelkomplexe vorlagen, mittels eines Magnetpartikelkonzentrators (MPC®-S, Firma Dynal) 3 mal mit PBS (Phosphatpuffer-Saline) gewaschen und die anhaftenden Zellen anschließend entsprechend des im folgenden beschriebenen RNS-Isolierungsprotokolls behandelt.

15 () 20 Als Alternative zur Abtrennung mittels Magnetpartikeln bietet sich eine immunologische Abtrennung mittels Durchflußzytometrie (Fluoreszenz-assoziierte Zellsortierung, FACS) an.

25 Hier wird eine erste relative Anreicherung der Tumorzellen durch Depletion der Erythrozyten erzielt. Dazu wird Vollblut (mit EDTA) mit einem hypotonen Erythrozyten-Lyse-Puffer vermischt und 30 Minuten bei Raum-

5 temperatur inkubiert. Die verbliebenen kernhaltigen Zellen werden zentrifugiert und in PBS/BSA resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen werden anschließend mit Antikörpern inkubiert, die mit einem Fluorophor markiert sind. Die Zielzellen, die durch Bindung an einen Antikörper fluoreszierend markiert sind, wurden dann über FACS abgetrennt.

10 Alternativ bietet sich eine Anreicherung durch Dichtegradienten-Zentrifugation an. Durch eine derartige Zentrifugation mit unterschiedlichen Dichtegradienten werden Zellen unterschiedlicher mittlerer Volumendichte voneinander getrennt. Mononukleare Blutzellen werden mittels eines Ficoll-Hypaque-Gradienten (Firma 15 Pharmacia, Uppsala, Schweden) separiert und anschließend zweifach mit PBS/1% FCS gewaschen. Anschließend erfolgt eine Festphasen-gekoppelte Anreicherung (z.B. über Magnetpartikel) bzw. eine Flüssigphasen-basierte 20 Abtrennung (FACS) der Zielzellen wie oben beschrieben.

2. mRNS-Isolierung

25 Als erstes erfolgt eine Isolierung der Gesamt-RNS der wie oben beschrieben abgetrennten Zellen. Diese erfolgt mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit (Firma Qiagen, Hilden) nach dortigen Herstellerangaben, wobei der Lysis-Puffer direkt zu den an die Magnetpartikel gebundenen Zellen gegeben wurde. Durch einen zusätzlichen DNS-Verdau auf der Säule wird eine Kontamination mit genomischer DNS vermieden. Dieser DNS-Verdau 30 erfolgt mit dem RNase-Free DNase Set, Firma Qiagen, Hilden.

35 Alternativ kann auch eine mRNS-Isolierung, z. B. mittels Oligo(dT)-gekoppelter Magnetpartikel, Dynabeads®

mRNA Direct™ Micro Kit, (Firma Dynal)) erfolgen.
Auch diese Isolation erfolgt entsprechend der in dem
Kit angegebenen Herstellerangaben.

5 Als weitere Alternative zur RNS-Isolierung werden die
isolierten Zellen durch Zugabe von Trizol-Reagenz
(Firma Gibco BRL, NY, USA) lysiert und mittels Pipet-
te homogenisiert. Nach anschließender Chloroformex-
traktion wird die RNS-haltige wässrige Phase in Iso-
10 propanol bei -80 °C gefällt. Nach zweimaligem Waschen
und Zentrifugieren in 80 %igem Ethanol wird das Pel-
let an der Luft getrocknet und anschließend in RNase
freiem Wasser resuspendiert. Dieser Aufarbeitungs-
schrift erfolgt ebenfalls nach herkömmlichen Proto-
15 kolien.

3. Reverse Transkription

20 An die Isolierung der RNS schließt sich eine reverse
Transkription an, bei der die mRNS in cDNS umge-
schrieben wird.

()

25 Dazu wird die RNS in einem entsprechenden Volumen
Wasser gemäß dem Reaktionsansatz in Tabelle 6 zusam-
men mit Oligo(dT)15-Primern (Firma Promega, Mannheim)
für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und anschließend
direkt auf Eis inkubiert.

30

Tabelle 6: Komponenten der cDNS-Synthese

Die cDNS-Synthese erfolgt in einem 20 μ l-Reaktionsansatz

| Komponenten | Volumen | Endkonzentration |
|-------------------------------|---------------|--------------------|
| RNS/mRNS | 10 μ l | - |
| 10 x RT-Puffer | 2 μ l | 1 x |
| dNTP-Mix (je 5 mM) | 2 μ l | jeweils 0.5 mM |
| Oligo(dT)-Primer (10 μ M) | 2 μ l | 1 μ M |
| RNase-Inhibitor | 1 μ l | 0.5 Units/ μ l |
| Reverse Transkriptase | 1 μ l | 4 U |
| RNase-freies Wasser | ad 20 μ l | |

5

Die cDNS-Synthese erfolgte bei 37 °C für eine Stunde mit nachfolgender Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Erhitzen für 5 Minuten bei 95 °C und anschließender Abkühlung auf Eis. Hierzu wurde ein Sensiskript Reverse Transkriptase Kit, Firma Qiagen, Hilden nach dort angegebenen Protokollen verwendet.

10 Im Falle der Verwendung Oligo(dT)-gekoppelter Magnetpartikel bereits zur Isolierung von mRNS unterbleibt anschließend die Zugabe von Oligo(dT)-Primern, d.h. der Oligo(dT)-Linker dient zugleich als Primer für die reverse Transkription, wobei hier die Magnetpartikel im Ansatz verbleiben.

20

4. PCR

25 Anschließend an die Umschreibung der mRNS in cDNS erfolgt eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit β -Aktin als interner Kontrolle.

Dabei wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Oligonukleotide als PCR-Primer zur Amplifikation von cDNS

entsprechend verschiedener Markergene, wie sie in der ersten Spalte angegeben sind, verwendet.

()

Tabelle 7: Liste der PCR-Primer

| Primername | Sequenz | 5' → 3' | PCR-Produkt |
|--------------------------|---------------------------|---------|-------------|
| Tumomarker | | | |
| GA733.2 sense | AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA | | 395 bp |
| GA733.2 sense | TAACCGCGTTGTGATCTCCTTCTGA | | |
| EGFR sense | AGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAA | | 163 bp |
| EGFR antisense | GATCATAATTCCCTCTGCACATAGG | | |
| CEA sense | AGAAATGACGCAAGAGCCTATGTA | | 231 bp |
| CEA antisense | AACTTGTGTGTGTTGCTGCGGTAT | | |
| CA15-3 sense | TCAGCTTCTACTCTGGTGCACAAC | | 299 bp |
| CA-15-3 antisense | TGGTAGTAGTCGGTGCTGGATCT | | |
| Her-2 sense | CCCAGTGTGTCAACTGCAGCCAGT | | 265 bp |
| Her-2 antisense | CAGATGGGCATGTAGGAGAGGTCA | | |
| Claudin-7 sense | GTCTTGCCGCCTTGGTAGCTTGCT | | 225 bp |
| Claudin-7 antisense | TGGACTTAGGGTAAGAGCAGGGTG | | |
| GCAP/PLAP sense | GCCACGCAGCTCATCTCAAACATG | | 440 bp |
| GCAP/PLAP antisense | ATGATCGTCTCAGTCAGTGCAGCGG | | |
| GRPR sense | TCTCCCCGTGAACGATGACTGGTC | | 308 bp |
| GRPR antisense | TGAAGACAGACACCCCAACAGAGG | | |
| HMGI-C sense | AAAGGCAGCAAAACAAGAGTCCC | | 213 bp |
| HMGI-C antisense | CCAAGTGTGCTGAGGTAGAAATC | | |
| CK20 sense | ATCTCCAAGGCCTGAATAAGGTCT | | 336 |
| CK20 antisense | CCTCAGTTCCCTTTAATTCTTCAGT | | |
| MAGE3 sense | CTCCAGCCTCCCCACTACCATGAA | | 375 bp |
| MAGE3 antisense | TTGTCACCCAGCAGGCCATCGTAG | | |
| Stanniocalcin sense | AACCCATGAGGCAGCAGAATGA | | 254 bp |
| Stanniocalcin antisense | CGTTGGCGATGCATTAAAGCTCT | | |
| Interne Kontrolle | | | |
| Aktin sense | CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT | | 111 bp |
| Aktin antisense | ACAGGACTCCATGCCAGGAAGGA | | |

zu erfassenden Tumormarkers, wobei jeweils zwei Oligonukleotide (sense und antisense) als Primerpaar angegeben sind. Die Länge des PCR-Produktes, das durch die in Spalte zwei angegebenen Primer erzeugt wird, ist in Spalte drei angegeben. Die PCR wurde mit dem in Tabelle 8 angegebenen Ansatz durchgeführt.

5 Tabelle 8: PCR-Ansatz
10 Die PCR-Synthese erfolgte in einem
50 µl-Reaktionsansatz

| Komponenten | Volumen | Endkonzentration |
|----------------------|---------------------|------------------|
| cDNS | 6 µl | |
| 10 x PCR-Puffer* | 5 µl | 1 x |
| dNTP-Mix | 1 µl | jeweils 200 µM |
| Primer | s. Tabellen 7 und 9 | |
| Taq-DNA Polymerase** | 0,5 µl | 2,5 U |
| [Q-Solution***] | 10 µl] | |
| H ₂ O | ad 50 µl | |

(* enthält 15 mM MgCl₂; ** HotStarTaqTM DANN Polymerase; Qiagen, Hilden)

(*** Der Zusatz von 10 µl Q-Solution (Qiagen, Hilden) ist nur zum Nachweis von
15 GCAP/PLAP notwendig)

20 Tabelle 9 gibt eine Auflistung der spezifischen Primerkombination und Primerkonzentrationen als Endkonzentration im PCR-Ansatz an. In den folgenden Beispielen wird für die verschiedenen Tumorarten Brustkrebs, Darmkrebs und Hodenkrebs jeweils exemplarisch eine Multiplexkombination zu diesen Primern aufgezeigt, so wie sie in Tabelle 9 angegeben ist.

Tabelle 9: Auflistung der spezifischen Primerkombinationen und Primerkonzentration (Endkonzentration im PCR-Ansatz)

5

| Marker Primer | Brust- krebs-1 | Darm- krebs-1 | Hoden- krebs-1 |
|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| GA733.2 sense | 500 nM | 500 nM | 500 nM |
| GA733.2 antisense | 500 nM | 500 nM | 500 nM |
| EGFR sense | | 750 nM | |
| EGFR antisense | | 750 nM | |
| CEA sense | | 750 nM | |
| CEA antisense | | 750 nM | |
| CA15-3 sense | 400 nM | | |
| CA15-3 antisense | 400 nM | | |
| Her-2 sense | 300 nM | | |
| Her-2 antisense | 300 nM | | |
| Claudin-7 sense | 400 nM | | |
| Claudin-7 antisense | 400 nM | | |
| GCAP/PLAP sense | | | 800 nM |
| GCAP/PLAP antisense | | | 800 nM |
| GRPR sense | | | 500 nM |
| GRPR antisense | | | 500 nM |
| HMGI-C sense | | | 500 nM |
| HMGI-C antisense | | | 500 nM |
| β-Aktin sense | 100 nM | 200 nM | 100 nM |
| β-Aktin antisense | 100 nM | 200 nM | 100 nM |

Die PCR-Bedingungen (Zyklenzahl, Zyklenführung etc.)
sind in den Tabellen 10 und 11 gegeben.

Tabelle 10: PCR-Bedingungen

| | |
|--------------------|----------------------------|
| Vorabdenaturierung | 95 °C 15 min |
| Zyklus | |
| 1. Denaturierung | 94 °C 1 min |
| 2. Annealing | x °C 1 min (s. Tabelle 11) |
| 3. Extension | 72 °C 1 min |
| Finale Extension | 72 °C 10 min 4 °C Pause |

5

Tabelle 11: Multiplex-spezifische Annealingtemperatur und Zyklenzahl

| Marker | Brustkrebs-1 | Darmkrebs-1 | Hodenkrebs-1 |
|----------------------|--------------|-------------|--------------|
| Annealing-Temperatur | 60 °C | 58 °C | 58 °C |
| Zyklenzahl | 35 | 40 | 40 |

10

(Thermocycler: PCT 200; Biozym)

15

Die so erzeugten Amplifikate der cDNS wurden elektrophoretisch aufgetrennt mittels eines Bioanalyzer 2100 (Firma Agilent). Hierzu wurde 1 µl des PCR-Produktes in dem Bioanalyzer auf einem DNS-Chip (500) aufgetrennt und das Trennergebnis elektronisch dokumentiert. Auf diese Weise wurden die Figuren 1-10 erzeugt.

20

Alternativ werden 25 µl des PCR-Produktes über ein 2,5 %iges Agarosegel aufgetrennt und die DNS-Banden mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Dokumentation er-

folgt z.B. mit Hilfe des DUO Store Systems der Firma Intas.

Alternativ kann weiterhin eine Fragmentanalyse beispielweise mittels eines ABI Prism 310 Genetic Analyser (Firma PE Applied Biosystem, Weiterstadt) durchgeführt werden. Hierzu wird dann jeweils 1 µl des PCR-Produktes in der Verdünnung 1:50 eingesetzt. In diesem Falle werden fluoreszenzmarkierte Primer verwendet.

Figur 1 zeigt nun das Ergebnis eines erfindungsgemäßen Verfahrens für die Erkennung von Brustkrebszellen im Blut. Hierzu wurde Blut von Gesunden eine definierte Menge an Tumorzellen einer Brustkrebszelllinie zugegeben. Die zugegebene Zellzahl betrug dabei 10 Zellen (10 Z) bzw. 100 Zellen (100 Z) pro Milliliter Blut. Figur 1A und 1B zeigen nun jeweils elektrophoretische Auftrennungen, wobei die einzelnen Banden hier und im folgenden mit denselben Begriffen beschriftet sind. Der Begriff Leiter bezeichnet Calibratoren von 50-600bp Länge, mit RT-Ko ist eine Kontrolle bezeichnet, die keinerlei mRNA enthielt, mit PCR-Ko ist eine Kontrollmessung bezeichnet, die keinerlei cDNS vor der PCR enthielt. Mit „Blut“ ist die Blutprobe ohne inokulierte Tumorzellen, mit 10 Z die Blutprobe mit 10 inokulierten Tumorzellen pro Milliliter und mit 100 Z die Blutprobe mit 100 inokulierten Tumorzellen pro Milliliter bzw. pro 5 Milliliter bezeichnet. Mit „Zelllinie“ ist eine Kontrollmessung mit einer großen Zellzahl der Tumorzelllinie in der Probe bezeichnet.

In Figur 1 sind Ergebnisse dargestellt, wenn die Selektion im ersten Schritt mit lediglich einem, zweien oder allen drei der folgenden Antikörper HMPV.2,

GP1.4 und Ber-Ep 4 durchgeführt wurde. Es ist unmittelbar zu erkennen, daß bei Verwendung lediglich eines Antikörpers der Nachweis des Tumormarkers CA 15.3 (Muc1) nur gering ist. Die besten Ergebnisse werden 5 erzielt, wenn zwei der Antikörper, nämlich HMPV.2 und Ber-Ep 4 bzw. GP1.4 und Ber-Ep 4 zum Nachweis eingesetzt werden. Bereits die Kombination aller drei Antikörper ist, wie man an der Intensität der Banden für den Tumormarker CA 15.3 erkennen kann, effektiver. Damit ist nachgewiesen, daß bei geeigneter Auswahl 10 einer bestimmten Anzahl von spezifischen Antikörpern ein erheblich verbessertes Ergebnis beim Nachweis von Tumorzellen möglich ist. Insbesondere zeigt sich auch, daß der simple Schluß, daß unter 15 Einsatz von mehreren Antikörpern die Sensitivität zwangsweise steigen würde, nicht möglich ist. Das Gegen teil ist unter Umständen der Fall, da eine unspezifische Reaktion mit steigender Zahl von Antikörpern eher möglich wird. Es ist daher von besonderer Bedeutung, experimentell eine geeignete Kombination von 20 Antikörpern zu ermitteln.

Figur 2 zeigt nun Ergebnisse von Nachweisverfahren, bei denen in Figur 2A keine Vorauswahl mittels Antikörpermarkierung und in Figur 2B eine Vorauswahl mittels Antikörpermarkierung durchgeführt wurde. In Figur 2 sind dabei Kombinationen der Antikörper HMPV.2, Ber-Ep 4 und GP1.4 als Zweierkombination bzw. sämtlicher 25 drei Antikörper bestimmt worden. Zugleich wurde eine Multiplexbestimmung von insgesamt vier Markern, nämlich GA 733.2, CA 15.3, Her 2/neu sowie Claudin 7, durchgeführt. Auch hier wurden wieder 10, 100 bzw. 30 1000 Tumorzellen einer Brustkrebszelllinie in Blut inokkuliert und anschließend nachgewiesen. Hier zeigt sich, daß ohne Antikörper-Selektionierung ein Hintergrundexpression für einige der mRNA-Marker (GA 733.2, 35

CA 15.3 und Her 2/neu) erfaßt wird. Ein derartiger Hintergrund läßt sich bei Einsatz jeder der in Figur 2B dargestellten Antikörperkombinationen zur Vorauswahl der auf mRNS zu untersuchenden Zellen vermeiden.

5 Interessant ist in Figur 2B wiederum, daß der Einsatz von drei Antikörpern dem Einsatz von zwei Antikörpern, z. B. GP 1.4 mit Ber-Ep 4 nicht unbedingt überlegen ist. Die Auswahl bestimmter Antikörperkombinationen sowie die Auswahl bestimmter mRNS-Marker ermöglicht es jedoch, bis herab zu 10 Zellen pro Milliliter Blut ohne jeglichen unspezifischen Hintergrund die entsprechenden gesuchten Tumorzellen zu erfassen.

10 Die Hintergrundexpression konnte eliminiert und die Sensitivität beträchtlich gesteigert werden (s. Bande für Claudin 7).

15

In Figur 3 ist das Ergebnis eines erfindungsgemäßen Verfahrens mit in Blut inokulierten Tumorzellen aus einer Hodenkrebszelllinie dargestellt. Wiederum werden sämtliche Tumorzellen aus der Blutprobe selektiert, die durch einen der dargestellten Antikörper markiert sind. Anschließend wird auf insgesamt vier mRNS-Marker (GCAP, GA 733.2, GRPR und HGMI-C) untersucht. Hier zeigt sich, daß bei Einsatz nur eines Antikörpers wie Ber-Ep 4 mittels des Markers HGMI-C lediglich bis herab zu 10 Zellen pro Milliliter Blut erfaßt werden und bei Einsatz des Antikörpers MOC-31 überhaupt keine Hodenkrebszellen erfaßt werden. Das-selbe gilt für den Antikörper 8B6, der lediglich eine geringe Sensitivität aufweist.

20

()

25

30

Die Kombination der Antikörper Ber-Ep 4 und 8B6 führt ebenfalls zu einem mangelhaften Nachweis mittels des Markers HGMI-C sowie auch die Kombination der Antikörper Ber-Ep 4 und MOC-31. Ein optimales Nachweisergebnis für sämtliche vier untersuchten Marker ergibt

35

5 sich für Hodentumorzellen bei Einsatz von insgesamt drei Antikörpern Ber-Ep 4, MOC-31 und 8B6, wo bis herab zu 2 Zellen pro Milliliter Blut sicher über jeden einzelnen der Marker nachgewiesen werden. Werden erfindungsgemäß mit den zwei Nachweisreaktionen zwei 10 Marker nachgewiesen, so läßt sich bei Auswahl von zwei Markern aus den für Figur 3 verwendeten Markern ein sicherer Nachweis einer minimalen Zellenzahl bei gleichzeitiger Vermeidung einer Hintergrunderfassung durchführen.

15 Figur 4 zeigt den Nachweis von Darmkrebszellen, die in Blut eines Gesunden inkokuliert wurden. Hier zeigt sich unmittelbar, daß der Einsatz einer Kombination der Antikörper Ber-Ep 4 und MOC-31 zu einer verbesserten Empfindlichkeit bezüglich des mRNS-Markers 20 EGF-R führt. Beim Einsatz der beiden Antikörper gleichzeitig wird eine Nachweisempfindlichkeit von 100 Zellen pro Milliliter Blut erreicht, während bei Einsatz lediglich eines Antikörpers die Empfindlichkeit bei ca. 1000 Zellen pro Milliliter Blut liegt.

() 25 Figur 5 zeigt einen Versuch, bei dem mittels einer Antikörperkombination von Ber-Ep 4, HMPV.2 und GP1.4, die mit zumindest einem der Antikörper markierten 30 Zellen selektiert wurden und anschließend auf die mRNS-Marker GA 733.2, CA 15.3, Her 2 und Claudin 7 untersucht wurden. Allerdings wurde hier dem Blut der Gesunden keine Tumorzelle zugegeben sondern definier- te Mengen von Epithelialzellen. Wie aus Figur 5 un- mittelbar hervorgeht, zeigen lediglich zwei der Mar- ker bei einer sehr hohen Zahl von epithelialen Zellen ein positives Ergebnis.

35 In Figur 6 wurden Tumorzellen zweier verschiedener Brustkrebszelllinien (MCF-7 und SKBR-3) einer Blutprobe

zugegeben. Als Antikörper wurden die Antikörper Ber-Ep 4, HMPV.2 und GP1.4 in Kombination eingesetzt. Wie unmittelbar zu erkennen ist, wird durch den Einsatz der vier mRNS-Marker GA 733.2, CA 15.3, Her 2 und 5 Claudin 7 jeweils gesichert bis herab zu 10 Zellen der einzelnen Zelllinien pro Milliliter eine Erkennung der Brustkrebszellen gewährleistet. Eine unspezifische Reaktion in Blut ohne Brustkrebszellen trat nicht auf. Allerdings sind die Tumormarker GA 733.2 10 und CA 15.3 für die Zelllinie 2 (SKBR-3) sensitiver, während der Tumormarker Her 2 für die Zelllinie 1 (MCF-7) sensitiver ist. So können dann auch die einzelnen Untertypen von Brustkrebszellen anhand des 15 aufgetretenen Markermusters voneinander unterschieden werden.

Auch in Figur 7 sind Brustkrebszellen verschiedener Zelllinien (MCF-7) in Figur 7A und SKBR 3 in Figur 7B 20 in Blut inokuliert worden. Als Antikörper zur Selektion der Zellen aus der Blutprobe wurden die Antikörper Ber-Ep 4, HMPV.2 und GP1.4 in Kombination verwendet. Es ist unmittelbar zu erkennen, daß bei Einsatz einer Kombination der mRNA-Marker GA 733.2, CA 15.3 25 Her 2 und Claudin 7 in jedem Falle mindestens einer der Marker bis herab zu 2 Zellen pro 5 Milliliter positiv reagiert, ohne daß das Blut ohne Tumorzellen einen Expressionshintergrund liefern würde. Auch hier ist wieder ein differenzielles Ansprechverhalten der 30 beiden Zelllinien auf die vier unterschiedlichen mRNS-Marker zu erkennen.

Befinden sich beispielsweise jedoch in einer Blutprobe beide Zelllinien, so wäre durch die gewählt Marker-kombination in jedem Falle bis herab von 2 Zellen pro 35 5 Milliliter Blut eine Erkennung beider Zelllinien gewährleistet, d. h. der Nachweis von Brustkrebszellen

im Blut wäre unabhängig vom Zelltyp der Brustkrebszellinie mit hoher Sensitivität möglich.

5 Figur 8 zeigt den Nachweis von Darmkrebszellen, die in Blut inokuliert wurden. Dabei erfolgte die Selektion der Zellen mit den zwei Antikörpern Ber-Ep 4 und MOC-31. Der molekularbiologische Nachweisschritt erfolgte mit den mRNA-Markern GA 733.2, CEA und EGF-R. 10 Zwei Tumorzellen waren in 5 Milliliter Blut nachweisbar.

15 Figur 9 zeigt wiederum eine Messung mit einer Kombination aus drei Antikörpern Ber-Ep 4, MOC-31 und 8B6 sowie den mRNA-Markern GCAP/PLAP, GA 733.2, GRPR und HMGI-C an Blut, in das Hodenkrebszellen inokuliert wurden.

20 Mit jedem der molekularbiologischen Marker gelingt bei Einsatz dieser Dreierkombination von Antikörpern für die Zellselektionierung im immunologischen Selektionierungsschritt der Nachweis bis herab zu 2 Zellen 25 pro 5 Milliliter.

Figur 10 zeigt abschließend die Abtrennung von seltenen Zellen aus dem Zellgemisch eines Biopsiematerials. Hierzu wurden Biopsiematerial aus Brustgewebe, das Tumorgewebe mit einem vermuteten Primärtumor enthielt, mechanisch vereinzelt und über Gaze von Zelltrümmern, Bindegewebe etc. getrennt. Das gewonnene 30 Zellgemisch, das sowohl Zellen des vermuteten Tumorgewebes als auch Zellen des umliegenden gesunden Gewebes enthielt, wurde einer Zellselektion mit einem an eine Festphase gekoppelten Antikörpermisch (Magnetpartikel mit Antikörpern GP1.4, HMPV.2 und Ber-Ep 4) versetzt und nach Inkubation zur Herstellung der 35 Antigen-Antikörperbindung magnetisch separiert. An-

schließend erfolgte ein mRNS-Nachweis bezüglich der Marker GA 733.2 und Her 2. Als Kontrolle wurde zu-
gleich eine Zelllinie eines Brustkrebses parallel
ebenfalls bestimmt. Wie zu erkennen ist, erfolgt ein
5 positiver Nachweis, daß die Biopsie tatsächlich einen
Brustkrebs-Tumor enthielt.

Die Banden, die in den Figuren 8 und 9 mit „Positiv-
kontrolle“ gekennzeichnet sind, zeigen Ergebnisse von
10 Proben mit der Zelllinien HT 29 für Darmtumor (Fig. 8)
bzw. Tera/1 für Hodentumor (Fig. 9).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektionierung und/oder zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von vorbestimmten biologischen Zellen aus bzw. in einer biologische Zellen enthaltenden Probe, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einer vorbestimmten Kombination von mindestens zwei Antikörpern und/oder Antikörperderivaten, die mit ihren Bindungsstellen an verschiedene Epitope der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise binden, und/oder mit mindestens einem bispezifischen Antikörper und/oder Antikörperderivat, der/das mit seinen beiden Bindungsstellen an unterschiedliche Epitope der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise bindet, versetzt wird, die mit mindestens einem der Antikörper und/oder Antikörperderivate markierten Zellen aus der Probe abgetrennt werden, und die abgetrennten Zellen mit einer vorbestimmten Kombination mindestens zweier molekularbiologischer Nachweisreagentien geprüft werden, wobei die mindestens zwei Nachweisreagentien mit mindestens einem Bestandteil der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise reagieren.
2. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Nachweisreagentien verwendet werden, die mit

verschiedenen Bestandteilen der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise reagieren.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung der markierten Zellen in Flüssigphase oder Festphase erfolgt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auf Festphasen gekoppelte Antikörper oder Antikörperderivate verwendet werden, um die Zielzellen aus der Probe abzutrennen.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mit Fluorophoren markierte Antikörper oder Antikörperderivate verwendet werden und die Abtrennung der markierten Zellen aus der Probe mittels Durchflußzytometrie (fluoreszenzassoziierte Zelltrennung, FACS) erfolgt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mit magnetischen bzw. pseudomagnetischen Partikeln gekoppelte Antikörper oder Antikörperderivate verwendet werden und zur Abtrennung der markierten Zellen aus der Probe die magnetischen bzw. pseudomagnetischen, antikörpergekoppelten Partikel nach der Mischung

mit der Probe magnetisch von der Probe getrennt werden.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper oder Antikörperderivate Bindungsstellen aufweisen, die an Tumorzellen vorzugsweise binden.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper oder Antikörperderivate Bindungsstellen aufweisen, die an Zellen eines oder mehrerer bestimmter Tumortypen oder -untertypen vorzugsweise binden.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Abtrennung von Tumorzellen oder Zellen eines bestimmten Tumortyps oder -subtyps die Antikörper oder Antikörperderivate Bindungsstellen aufweisen, die an Epitope eines epithelialen Antigens, eines epithelialen Membranantigens, des Antigens MUC1 und/oder des Antigens PLAP binden.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Antikörper GP1.4, MOC-31, Ber-EP4, HMPV.2, 8B6, E29 und/oder 131-11741 verwendet wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Abtrennung von Tumorzellen allgemein oder eines bestimmten Typs oder Subtyps eine Kombination von Antikörpern verwendet wird, die die Antikörper Ber-EP4 und MOC31 oder mindestens zwei der Antikörper HMPV.2, GP1.4 und Ber-EP4 enthält.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Abtrennung von Brusttumorzellen eine Kombination von Antikörpern verwendet wird, die mindestens zwei der Antikörper 131-11741, GP1.4, E29 und HMPV.2 oder mindestens zwei der Antikörper HMPV.2, GP1.4 und Ber-EP4 enthält.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Abtrennung von Darmtumorzellen eine Kombination von Antikörpern verwendet wird, die die Antikörper Ber-EP4 und MOC-31 enthält.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Abtrennung von Hodentumorzellen eine Kombination von Antikörpern verwendet wird, die mindestens zwei der Antikörper MOC31, Ber-EP4 und 8B6 enthält.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Bestandteile ein Sequenzabschnitt einer

Nukleinsäure, DNS, RNS und/oder Sequenzabschnitte verschiedener Nukleinsäuren, DNS, RNS und/oder verschiedene Sequenzabschnitte derselben Nukleinsäuren, DNS, RNS und/oder verschiedene Allele derselben Nukleinsäure, DNS, RNS nachgewiesen werden.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die abgetrennten Zellen mit den Nachweisreagentien auf die Expression einer vorbestimmten Kombination mindestens zweier mRNA-Abschnitte geprüft werden, wobei die Expression dieser mindestens zwei mRNA-Abschnitte zumindest in den zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise erfolgt.
17. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Tumorzellen oder Zellen eines bestimmten Tumortyps oder -subtyps eine Kombination von mRNA-Abschnitten geprüft wird, die mRNA-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene GA733.2, EGFR, CEA, HER2/neu, Claudin-7 (CLDN7), GCAP(ALPPL2)/ALPP, GRPR, HMGIC, CK20, MAGE3, MUC1 und Stanniocalcin (STC1) enthält.
18. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Tumorzellen oder Zellen eines bestimmten Tumortyps oder -subtyps eine Kombination von

mRNS-Abschnitten geprüft wird, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene EGFR, GA733.2 und HER-2/NEU enthält.

19. Verfahren Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Brusttumorzellen eine Kombination von mRNS-Abschnitten verwendet wird, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene GA733.2, MUC1, Her-2/neu, Claudin7, CK20, MAGE-3, Stanniocalcin, EGFR und CEA enthält.
20. Verfahren Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Brusttumorzellen eine Kombination von mRNS-Abschnitten verwendet wird, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten der beiden Gene GA733.2 und MUC1, korrespondierenden zu Sequenzabschnitten der beiden Gene Her-2/neu und Claudin7, korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene CK20, MAGE-3 und MUC1 und/oder korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene Stanniocalcin, EGFR und CEA enthält.
21. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Darmtumorzellen eine Kombination von mRNS-Abschnitten verwendet wird, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene CK20, EGFR, GA733.2, CEA und Stanniocalcin enthält.

22. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Darmtumorzellen eine Kombination von mRNS-Abschnitten verwendet wird, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene CK20, EGFR, CEA und Stanniocalcin und/oder korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene EGFR, CEA und GA733.2 enthält.
23. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Hodentumorzellen eine Kombination von mRNS-Abschnitten verwendet wird, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene ALPP/ALPPL2 (GCAP), GA733.2 (=EGP-40), HMGI-C, GRPR enthält.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die mRNS-Abschnitte unter Verwendung von Polymerasekettenreaktion (PCR), LCR, NASBA RT-PCR und/oder Hybridisierungsverfahren vervielfältigt und/oder nachgewiesen werden.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die mRNS der abgetrennten Zellen in cDNS revers transkribiert, die cDNS vervielfältigt und anschließend das Vorhandensein oder Fehlen des nachzuweisenden mRNS-Abschnittes erfaßt wird.

26. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die vervielfältigte cDNS durch geeignete Restriktionsenzyme verdaut und anhand der erzeugten cDNS-Bruchstücke das Vorhandensein oder Fehlen der nachzuweisenden mRNS erfaßt wird (Fragmentanalyse).
27. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die der nachzuweisenden mRNS entsprechende cDNS mittels fluoreszenzbasierter Echtzeit -PCR bestimmt wird.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß als interne Kontrolle die mRNS des Proteins β -Aktin erfaßt wird.
29. Diagnosekit zur Selektionierung und/oder zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von vorbestimmten biologischen Zellen aus bzw. in einer biologische Zellen enthaltenden Probe, dadurch gekennzeichnet, daß es eine vorbestimmte Kombination von mindestens zwei Antikörpern und/oder Antikörperderivaten enthält, die mit ihren Bindungsstellen an verschiedene Epitope der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise binden, und/oder mit mindestens einem bispezifischen Antikörper und/oder Antikörperderivat, der/das mit seinen beiden Bindungsstellen an unterschiedliche Epitope der zu

selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise bindet sowie mindestens zwei molekularbiologischen Nachweisreagentien, wobei die mindestens zwei molekularbiologischen Nachweisreagentien mit mindestens einem Bestandteil der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise reagieren.

30. Diagnosekit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens zwei Nachweisreagentien mit verschiedenen Bestandteilen der zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise reagieren.
31. Diagnosekit nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper oder Antikörperderivate mit Fluorophoren markiert sind.
- () 32. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper oder Antikörperderivate an Festphasen gekoppelt sind.
33. Diagnosekit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper oder Antikörperderivate an magnetische bzw. pseudomagnetische Partikel gekoppelt sind.
- 5 34. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper oder Antikörperderivate Bindungsstellen aufweisen, die an Tumorzellen vorzugsweise binden.

35. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper oder Antikörperderivate Bindungsstellen aufweisen, die an Zellen eines oder mehrerer bestimmter Tumortypen oder -untertypen vorzugsweise binden.
36. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß zur Abtrennung von Tumorzellen oder eines bestimmten Typs oder Subtyps von Tumorzellen die Antikörper oder Antikörperderivate Bindungsstellen aufweisen, die an Epitope eines epithelialen Antigens, eines epithelialen Membranantigens, des Antigens MUC1 und/oder des Antigens PLAP binden.
37. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens einen der Antikörper GP1.4, MOC-31, Ber-EP4, HMPV.2, 8B6, E29 und/oder 131-11741 aufweist.
38. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Abtrennung von Tumorzellen oder Zellen eines bestimmten Tumortyps oder -subtyps die Antikörper Ber-EP4 und MOC31 oder mindestens zwei der Antikörper HMPV.2, GP1.4 und Ber-EP4 enthält.
39. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Abtrennung von Brusttumorzellen mindestens zwei der Antikörper 131-11741, GP1.4, E29 und HMPV.2 oder mindestens zwei der Antikörper HMPV.2, GP1.4 und Ber-EP4 enthält.

42.

40. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Abtrennung von Darmtumorzellen die die Antikörper Ber-EP4 und MOC-31 enthält.
41. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Abtrennung von Hodentumorzellen mindestens zwei der Antikörper MOC31, Ber-EP4 und 8B6 enthält.
42. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreagenzien zum Nachweis eines Sequenzabschnitts einer Nukleinsäure, DNS, RNS und/oder von Sequenzabschnitten verschiedener Nukleinsäuren, DNS, RNS und/oder von verschiedenen Sequenzabschnitten derselben Nukleinsäuren, DNS, RNS und/oder von verschiedenen Allelen derselben Nukleinsäure, DNS, RNS nachgewiesen werden.
43. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreagenzien zum Nachweis der Expression einer vorbestimmten Kombination mindestens zweier mRNA-Abschnitte geeignet sind, wobei die Expression dieser mindestens zwei mRNA-Abschnitte zumindest in den zu selektionierenden bzw. nachzuweisenden Zellen vorzugsweise erfolgt.
44. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß die

43.

Nachweisreagentien zum Nachweis der Expression einer Kombination von mRNS-Abschnitten geeignet sind, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene GA733.2, EGFR, CEA, HER2/neu, Claudin-7 (CLDN7), ALPPL2 (GCAP) / ALPP (PLAP), GRPR, HMGIC, CK20, MAGE-3, MUC1 und Stanniocalcin (STC1) enthält.

45. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreagentien zum Nachweis der Expression einer Kombination von mRNS-Abschnitten geeignet sind, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene EGFR, GA733.2 und HER-2/NEU enthält.
46. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 45, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Brusstumorzellen die Nachweisreagentien zum Nachweis der Expression einer Kombination von mRNS-Abschnitten geeignet sind, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene GA733.2, Her-2/neu, Claudin7, CK20, MAGE-3, MUC1, Stanniocalcin, EGFR und CEA enthält.
47. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Brusstumorzellen die Nachweisreagentien zum Nachweis der Expression einer Kombination von mRNS-Abschnitten geeignet sind, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten der beiden Gene GA733.2 und

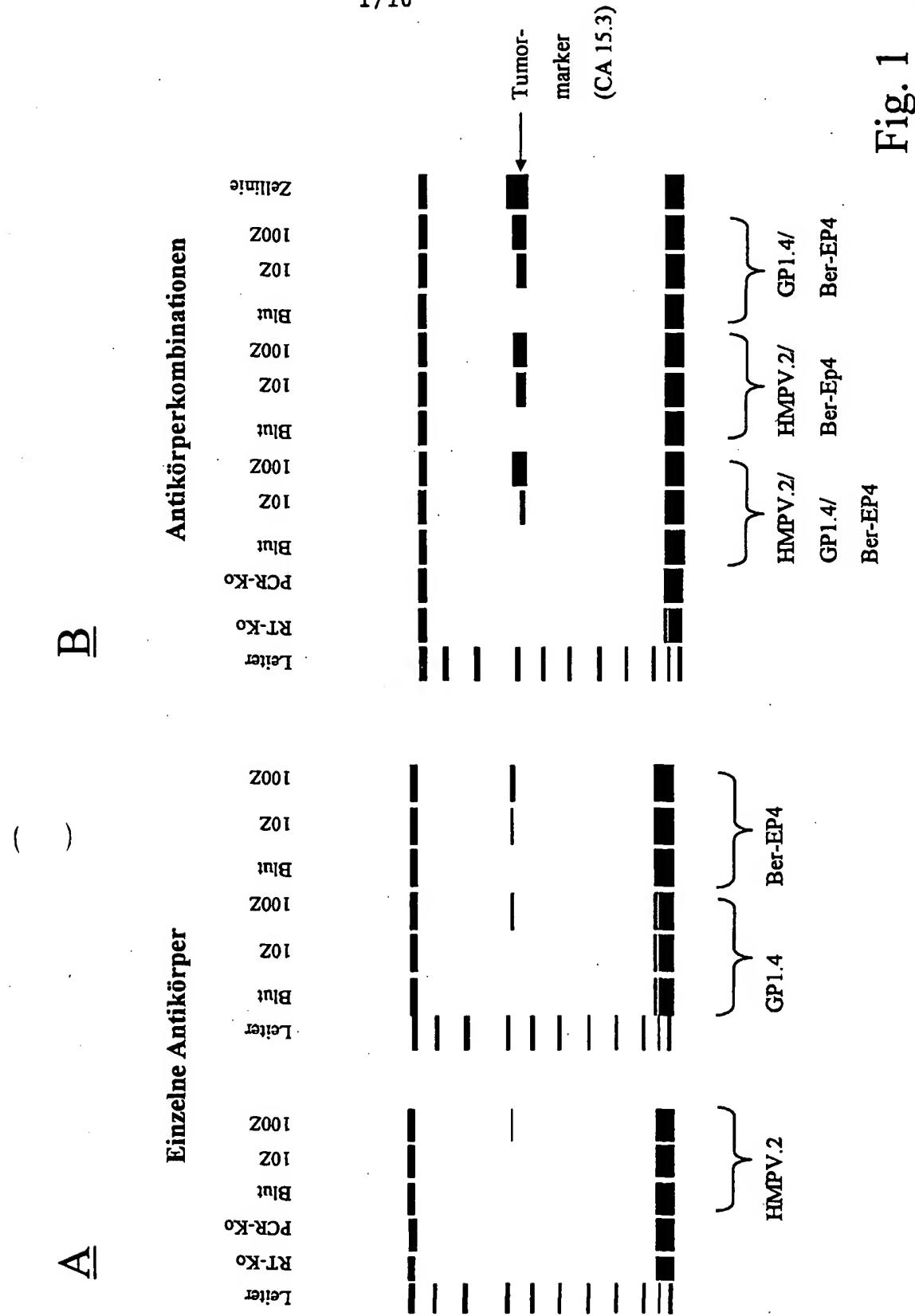
MUC1, korrespondierend zu Sequenzabschnitten der beiden Gene Her-2/neu und Claudin7, korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene CK20, MAGE-3 und MUC1 und/oder korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene Stanniocalcin, EGFR und CEA enthält.

48. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 47, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Darmtumorzellen die Nachweisreagentien zum Nachweis der Expression einer Kombination von mRNS-Abschnitten geeignet sind, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Genprodukte CK20, EGFR, GA733.2, CEA und Stanniocalcin enthält.
49. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 48, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Darmtumorzellen die Nachweisreagentien zum Nachweis der Expression einer Kombination von mRNS-Abschnitten geeignet sind, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene CK20, EGFR, CEA und Stanniocalcin und/oder korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene EGFR, CEA und GA733.2 enthält.
50. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Hodentumorzellen die Nachweisreagentien zum

Nachweis der Expression einer Kombination von mRNS-Abschnitten geeignet sind, die mRNS-Abschnitte korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene ALPP/ALPPL2 (GCAP), GA733.2 (=EGP-40), HMGI-C und GRPR enthält.

51. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 50, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreagenzien zum Nachweis der Expression von DNS-Abschnitten zumindest zwei Oligonukleotidpaare aufweist, wobei jedes Oligonukleotidpaar als Primerpaar zur Vervielfältigung der zu jeweils einem der mRNS-Abschnitte komplementären cDNS geeignet ist.
52. Diagnosekit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Oligonukleotid zumindest eines Primerpaars mit einem Fluorophor markiert ist.
53. Diagnosekit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Tumorzellen oder Zellen eines bestimmten Tumortyps oder Subtyps die Primerpaare zur Vervielfältigung von cDNS-Abschnitten korrespondierend zu Sequenzabschnitten mindestens zwei der Gene GA733.2, EGFR, CEA, HER-2/NEU, Claudin-7, ALPPL2 (GCAP)/ALPP, GRPR, HMGI-C, CK20, MAGE3, MUC1 und Stanniocalcin geeignet sind.

54. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 29 bis 53, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Reverse Transkriptase, eine Polymerase, eine Taq-Polymerase und/oder Restriktionsenzyme enthält.
55. Verwendung eines Verfahrens oder eines Diagnosekits nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum Nachweis von Zellen seltenen Typs in Suspensionen und Zellmischungen, insbesondere von Tumorzellen, Epithelzellen und/oder Endothelzellen in Körperflüssigkeiten, peripherem Blut, Sputum, Ascites, Lymphe, Urin, Knochenmark und/oder Biopsiematerial und/oder von fötalen Zellen in Amnionflüssigkeit oder maternalem peripherem Blut.
56. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Diagnostik und/oder Behandlungskontrolle von Tumorerkrankungen.
57. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Diagnostik und/oder Behandlungskontrolle von Hodentumor, Brusstumor und/oder Darmtumor.



一
六
五

B**A****Ohne Vorselektionierung**

RT-Ko

PCR-Ko

Leiter

GA 733.2
CA 15.3
Her 2
Claudin 7

Aktin

Kontrollen Ohne Antikörper-
Selektionierung

HMPV.2/
GP1.4/
Ber-EP4

HMPV.2/
Ber-EP4

Fig. 2**Mit Vorselektionierung**

RT-Ko
PCR-Ko
Leiter

RT-Ko
PCR-Ko
Leiter

GA 733.2
CA 15.3
Her 2
Claudin 7

Aktin

Kontrollen Ohne Antikörper-
Selektionierung

HMPV.2/
GP1.4/
Ber-EP4

HMPV.2/
Ber-EP4

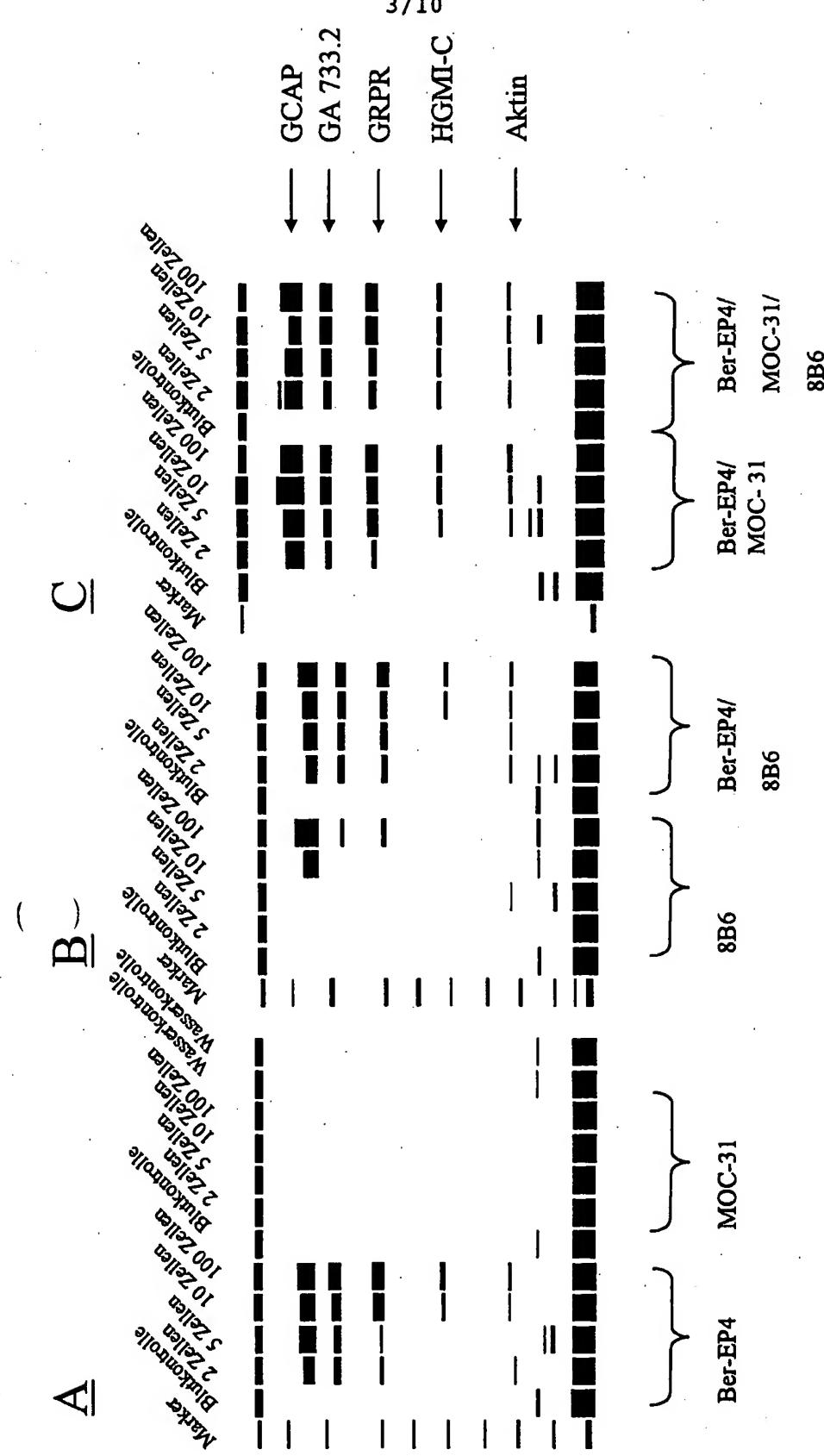


Fig. 3

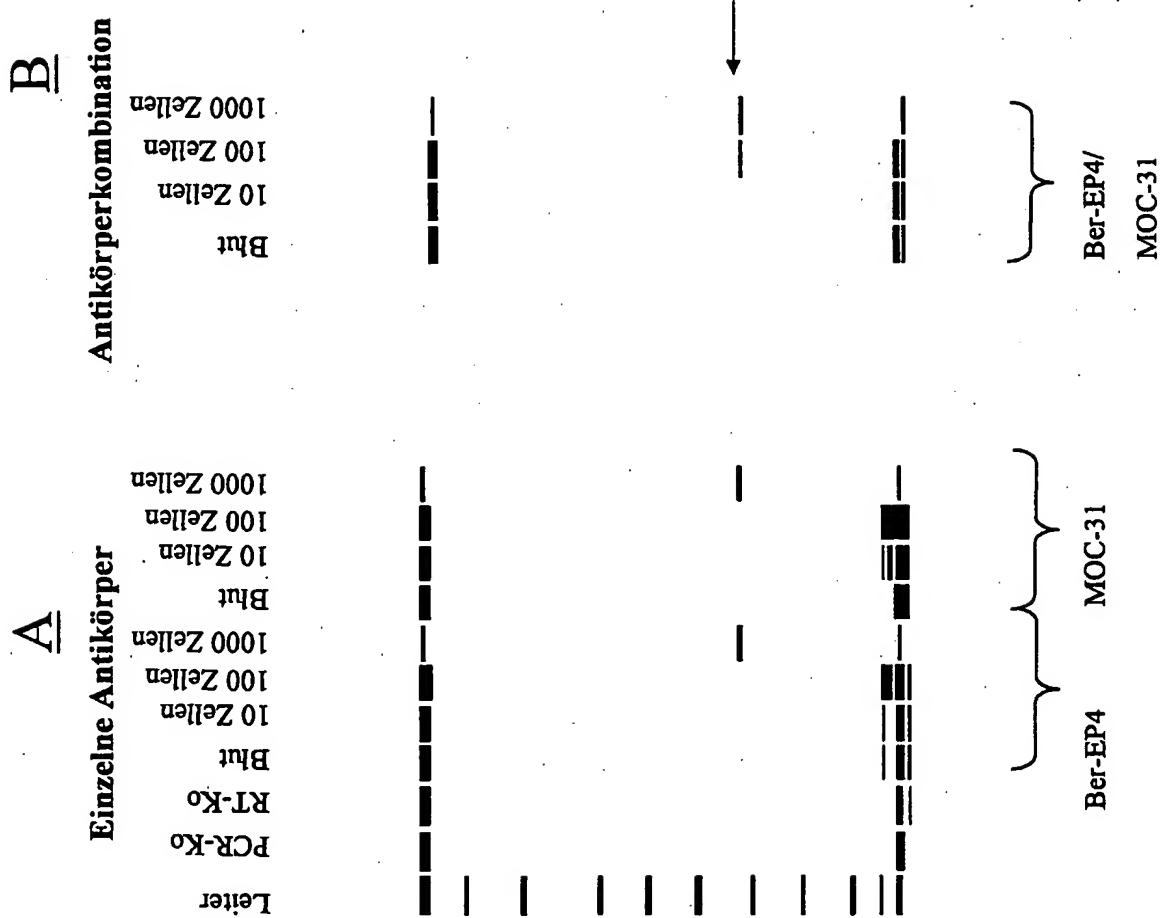


Fig. 4

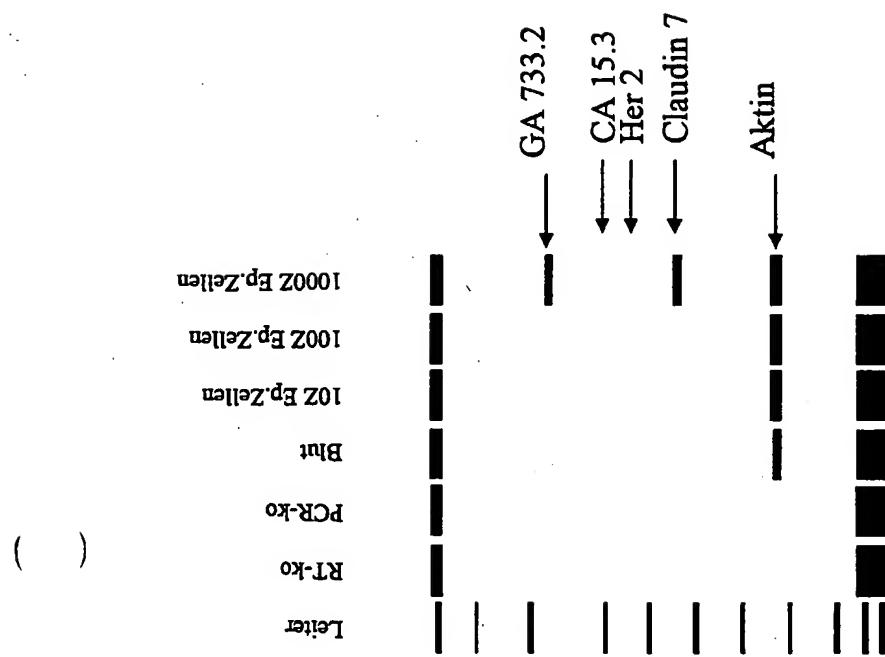


Fig. 5

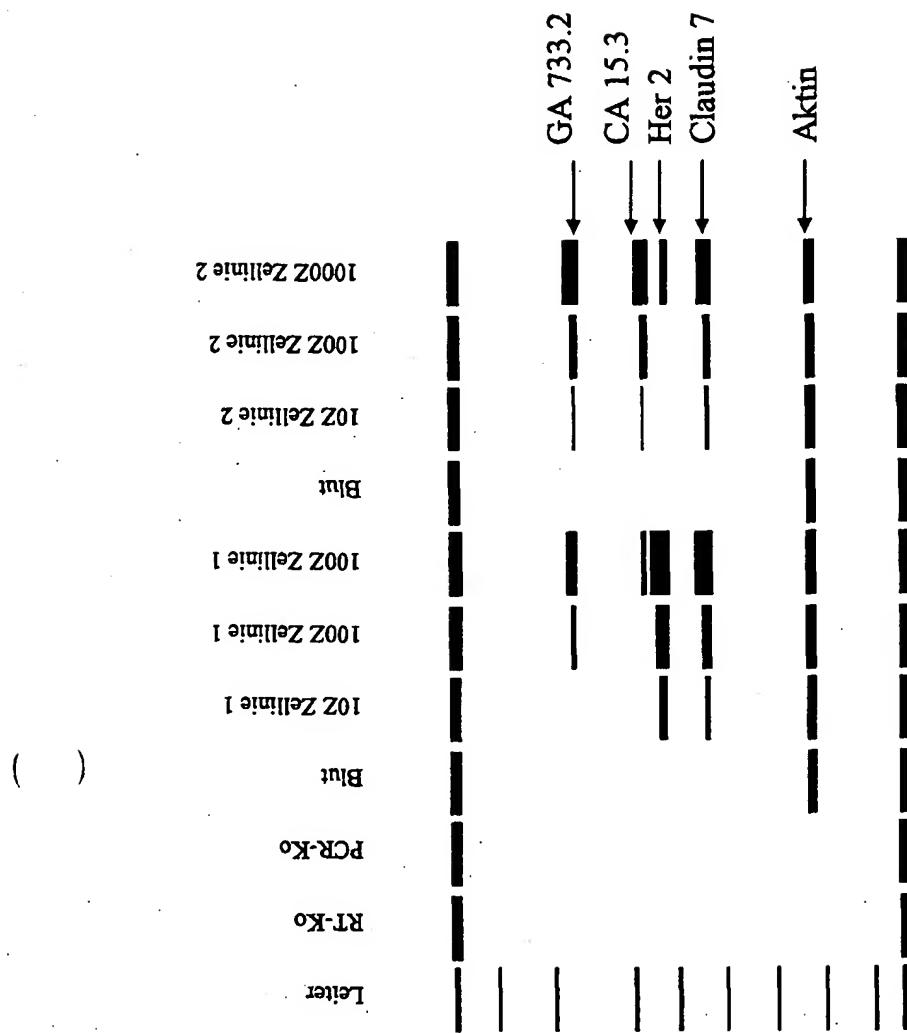


Fig. 6

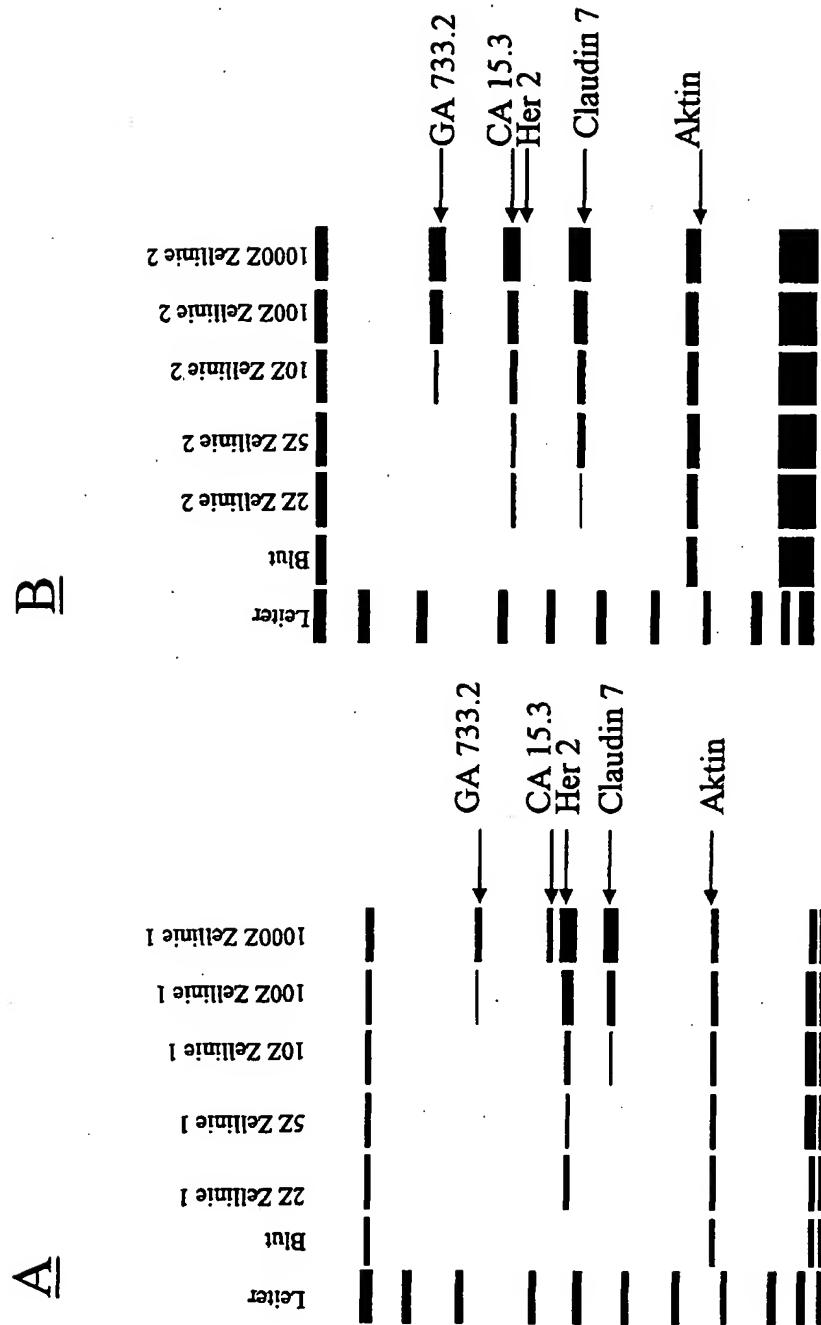
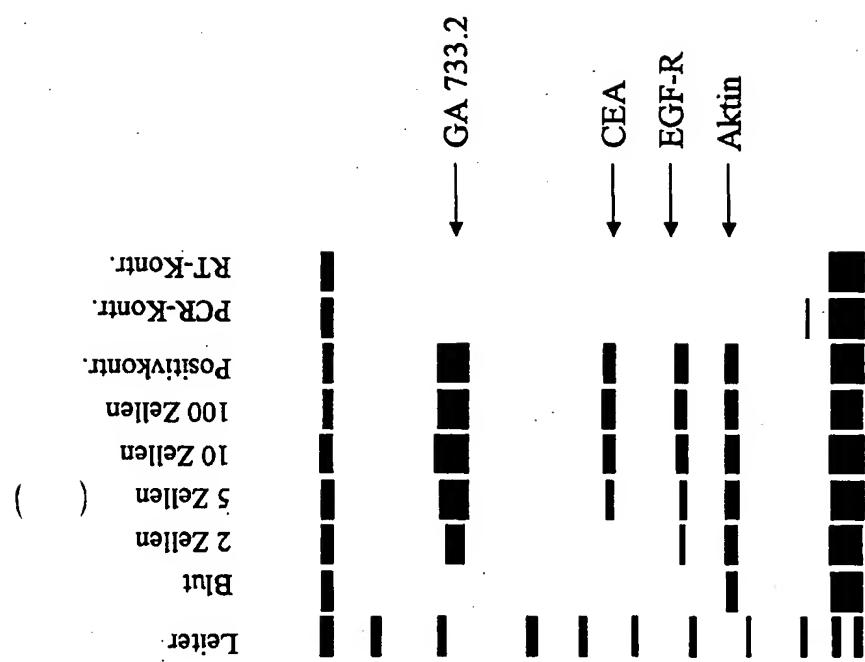


Fig. 7

Fig. 8



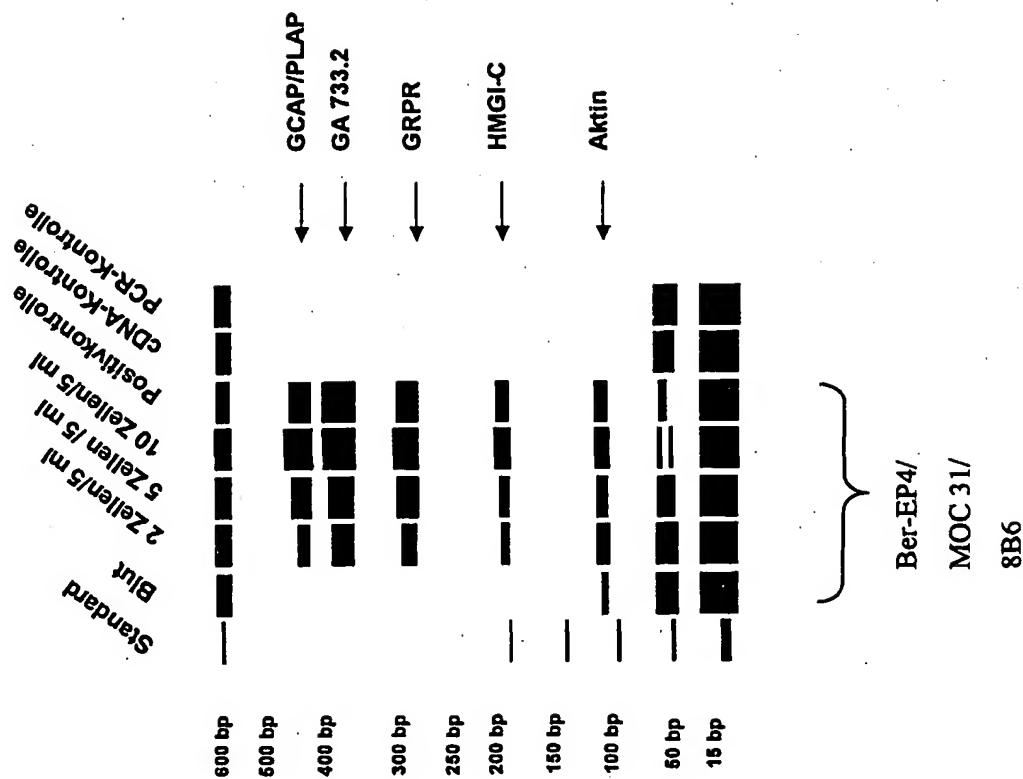


Fig. 9

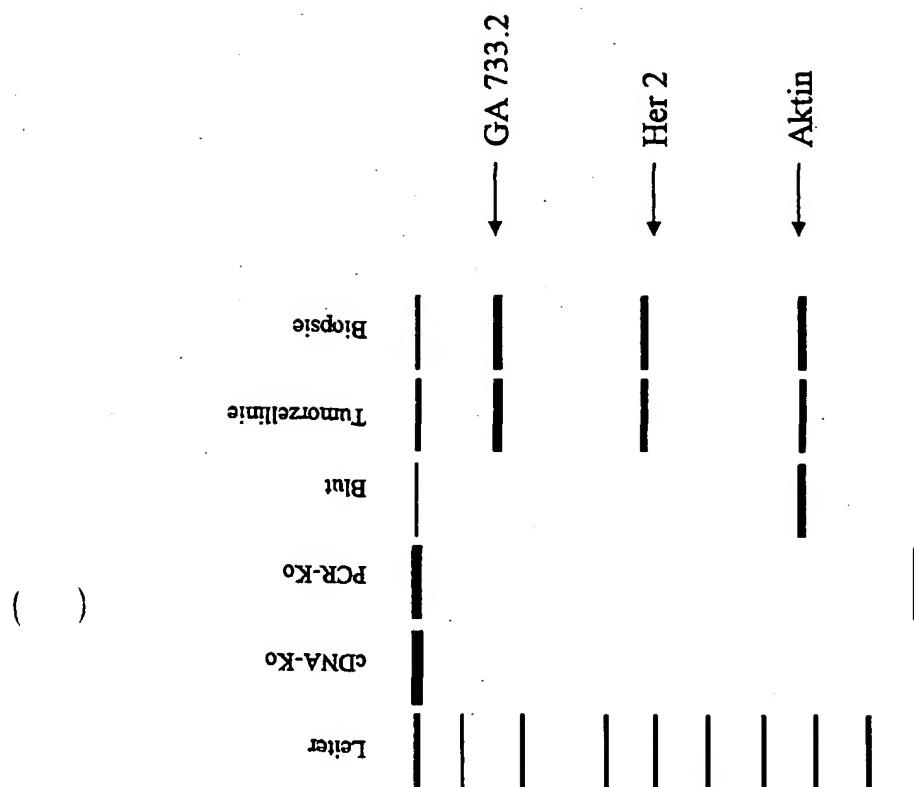


Fig. 10